

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»

ГБУЗ «Областной онкологический диспансер»

**НАСЛЕДСТВЕННЫЙ И СПОРАДИЧЕСКИЙ РАК
ТОЛСТОЙ КИШКИ. МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

Методические рекомендации

Иркутск
ИГМАПО
2016

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»
ГБУЗ «Областной онкологический диспансер»

НАСЛЕДСТВЕННЫЙ И СПОРАДИЧЕСКИЙ РАК ТОЛСТОЙ КИШКИ. МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Методические рекомендации

Иркутск
ИГМАПО
2016

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
Проксимальный и дистальный рак толстой кишки	6
Наследственный и спорадический рак толстой кишки	8
Диффузный семейный полипоз	8
Наследственный неполипозный колоректальный рак	11
Генетические синдромы	13
Меры профилактики и лечения наследственных форм колоректального рака	14
Патогенез рака толстой кишки	15
Варианты молекулярного патогенеза спорадического рака толстой кишки	15
Гены, вовлечённые в патогенез рака толстой кишки	15
Молекулярные маркеры прогноза и индивидуализации лечения колоректального рака	17
Прогностические маркеры рака толстой кишки	17
Маркеры чувствительности и резистентности к терапии	19
Лабораторные методы	23
Сигнальный путь эпидермального фактора роста EGFR как мишень для таргетной терапии	24
Моноклональные антитела против EGFR в таргетной терапии ...	26
Собственные результаты генетических исследований при колоректальном раке	27
Определение статуса K-ras гена пациентов Иркутской области, страдающих колоректальным раком	27
Возможности предоперационной таргетной терапии при нижнеампулярном раке прямой кишки	28
Заключение	31
Библиографические ссылки	32

УДК 616.345-006.6-085.28

ББК 55.694.33-5

НЗ1

Утверждено методическим советом ГБОУ ДПО ИГМАПО 3.11.2016 г.

Рецензенты:

П.И. Сандаков – канд. мед. наук доцент кафедры скорой медицинской помощи и медицины катастроф ГБОУ ДПО ИГМАПО;

В.Г. Лалетин – д-р мед. наук профессор кафедры онкологии и лучевой терапии ГБОУ ВПО ИГМУ

Авторы:

*А.В. Шелехов, В.В. Дворниченко, Е.В. Панферова, Р.И. Расулов,
Н.А. Москвина, Д.М. Пономаренко*

НЗ1 **Наследственный и спорадический рак толстой кишки. Молекулярно-генетические предикты эффективности химиотерапевтического лечения колоректального рака: метод. рекомендации / А.В. Шелехов, В.В. Дворниченко, Е.В. Панферова [и др.]. – Иркутск: РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2016. – 32 с.**

Представлено описание патогенеза наследственного и спорадического рака толстой кишки, молекулярных, генетических маркеров, характеризующих эффективность проводимого консервативного специализированного лечения злокачественных новообразований ободочной и прямой кишки.

Предназначены для ординаторов и врачей, обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования по специальностям «онкология», «колопроктология», «хирургия», «терапия».

УДК 616.345-006.6-085.28

ББК 55.694.33-5

© ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2016

© ГБОУ ВПО ИГМУ, 2016

© ГБУЗ ООД, 2016

Формат 60x84 1/16. Гарнитура Arial. Бумага SvetoCopi.

Уч.-изд. л. 2,0. Тираж 100. Заказ 1/140.

Отпечатано в РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО.

664079, Иркутск, мкр. Юбилейный, 100, к. 302.

Тел.: (3952)46-69- 26. E-mail: rio@igmapo.ru

Введение

Ведущая роль в причинах смертности от онкологических заболеваний принадлежит опухолям органов пищеварения. Ежегодно в мире регистрируется около 800 000 больных колоректальным раком и 440 000 смертей от этого заболевания. В России в 2015 г. впервые выявлено 36494 случаев заболевания раком ободочной кишки и 25951 – злокачественными новообразованиями ректосигмоидного отдела толстой кишки, прямой кишки и анального канала [3].

Принято считать, что риск развития колоректального рака в европейской популяции составляет 4–5 %, это означает, что в течение жизни 1 из 20 человек заболевает раком этой локализации.

В настоящее время известны следующие основные факторы риска заболевания раком ободочной кишки:

- возраст пациентов старше 50 лет;
- факторы питания (высококалорийная пища с избытком животных жиров и белков, недостаток растительной клетчатки, пищевые канцерогены);
- ожирение;
- малоподвижный образ жизни;
- курение.

Генетические синдромы:

- диффузный семейный полипоз;
- синдром Гарднера–Тернера;
- синдром Пейтца–Джигерса;
- болезнь Тюрка.

Предшествующие заболевания:

- наличие аденом ободочной кишки;
- наличие язвенного колита;
- болезнь Крона ободочной кишки;
- ранее перенесенный рак ободочной кишки;
- ранее перенесенный рак женских гениталий или молочной железы;
- наличие в анамнезе колоректального рака у кровных родственников.

За последние два десятилетия произошел несомненный прогресс в клинической онкологии. С появлением новых противоопухолевых препаратов с принципиально иными механизмами действия расширился контингент больных, получающих специфическую терапию, улучшилось качество их жизни, а по некоторым нозологическим формам увеличилась ее продолжительность. Так, при метастатическом раке ободочной кишки медиана продолжительности жизни с 6 месяцев в 80-годы XX в. возросла до 20 месяцев в 2000-х годах.

К сожалению, современная противоопухолевая терапия имеет ряд существенных недостатков, одним из которых является эмпирический характер ее назначения. На сегодняшний день отсутствуют абсолютные признаки чувствительности, резистентности опухоли к цитостатикам. Назначение противоопухолевой терапии основывается на основных фенотипи-

Список сокращений

ГТФ	гуанозинтрифосфат
ЛВ	лейковарин
ННКРР	наследственный неполипозный колоректальный рак
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РПЖ	рак поджелудочной железы
РТК	рак толстой кишки
САП	семейный аденоматозный полипоз
5-ФУ	5-фторурацил
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	<i>chromosomal instability</i>
DCC	<i>deleted in colorectal carcinogenesis</i>
DPD	<i>dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
HNPCC	<i>hereditary non polyposis colorectal cancer</i>
MYH	<i>mutation y homologue</i>
RER	<i>replication error phenotype</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>
TP	<i>thymidylate phosphorylase</i>
TS	<i>thymidylate synthase</i>
VEGF	<i>vascular endothelial factor</i>

стальной рак толстой кишки (РТК) также заметно отличаются друг от друга. Среди больных проксимальным РТК преобладают женщины, тогда как дистальный РТК (рис. 1) более характерен для мужчин.

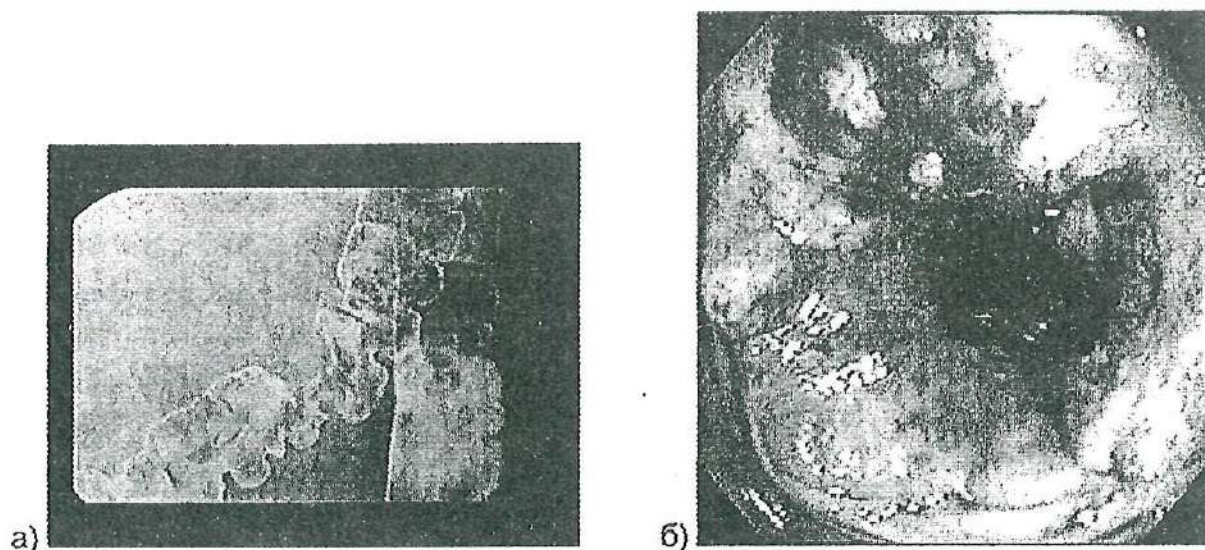


Рис. 1. Рак левой половины ободочной кишки (нисходящая ободочная кишка): а – ирригоскопия; б – эндоскопия

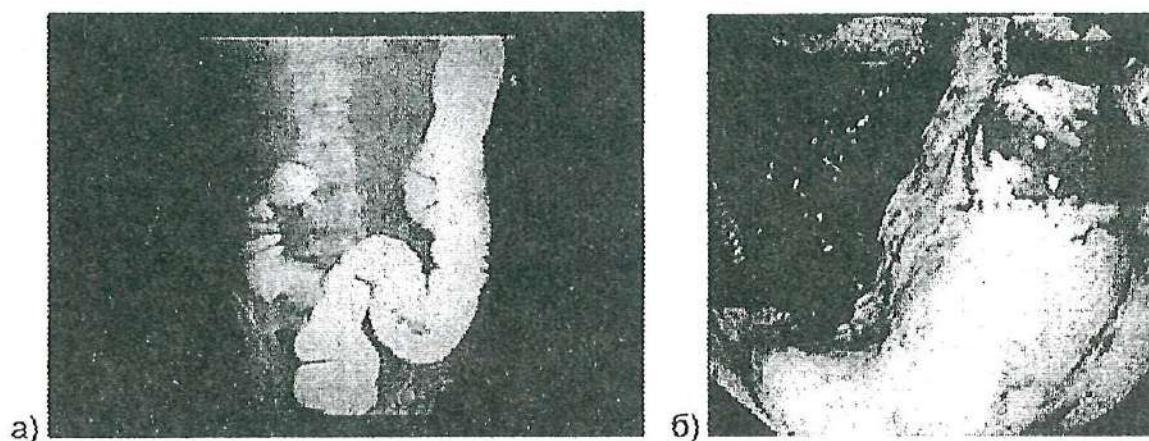


Рис. 2. Рак правой половины ободочной кишки (восходящая ободочная кишка): а – ирригоскопия; б – эндоскопия

Правосторонние опухоли (рис. 2) зачастую демонстрируют относительно сохраненный кариотип, в то время как левосторонним локализациям присущи комплексные хромосомные аномалии. Наиболее важен тот факт, что проксимальные РТК относительно чувствительны к терапии фторпиримидинами; напротив, дистальные опухоли толстой кишки зачастую характеризуются резистентностью к фторурацилу и его аналогам [11].

ческих характеристиках, таких как: локализация первичной опухоли, гистологический тип и степень ее дифференцировки, общее состояние больного, характер распространения опухолевого процесса и т.д.

Определение тактики после проведенной радикальной операции, а также при диссеминации опухолевого процесса, несомненно, осложняется отсутствием надежных прогностических факторов эффективности и токсичности лечения. Так, назначение адьювантной химиотерапии при колоректальном раке основывается на наличии поражения регионарных лимфоузлов и значении уровня раковоэмбрионального антигена. Однако известно, что у половины больных, радикально прооперированных по поводу колоректального рака, в течение первых 5–10 лет выявляются отдаленные метастазы [19].

Проводить или не проводить химиотерапию больным без метастазов в регионарных лимфоузлах (стадия Dukes B)? Вопрос дискуссионный. В таких случаях для определения лечебной тактики может быть полезным знание прогностических молекулярных маркеров. К существенным недостаткам противоопухолевой терапии следует отнести и ограниченную действенность цитостатиков; диапазон их активности колеблется от 20 до 80 %. Максимальная эффективность наблюдается у ограниченной группы препаратов, таких как таксаны, производные платины, таргетные препараты. При этом частота побочных явлений, нередко угрожающих жизни больного, остается достаточно высокой.

Знание молекулярно-генетической характеристики пациента позволило бы индивидуализировать дозу препарата и уменьшить риск появления токсических реакций.

Еще одним немаловажным недостатком противоопухолевой терапии является высокая стоимость препаратов. Стоимость курса лечения современными препаратами достигает десятков тысяч долларов в месяц.

Ожидается, что разработка маркеров химиочувствительности новообразований поможет уменьшить затраты на терапию за счет более обоснованного использования дорогостоящих лекарств.

ПРОКСИМАЛЬНЫЙ И ДИСТАЛЬНЫЙ РАК ТОЛСТОЙ КИШКИ

Условная граница между проксимальным (правым) и дистальным (левым) отделом толстой кишки проходит по селезеночному изгибу. Таким образом, к проксимальным участкам относят слепую кишку, а также восходящий и поперечный фрагменты ободочной кишки; нисходящая часть ободочной кишки, сигмовидная кишка и прямая кишка образуют дистальную порцию органа.

Существенно, что проксимальные и дистальные отделы толстой кишки демонстрируют значимые различия в отношении эмбрионального происхождения, морфологических и биохимических характеристик, а также паттерна экспрессии генов. Неудивительно, что проксимальный и ди-

Значительно позже были четко определены признаки заболевания, число и локализация полипов, их морфологическая характеристика, семейная и популяционная частота, риски развития РТК. J. Woodward в 1881 г. предложил подразделение полипов на первичные, возникающие на невидимом невооруженным глазом фоне, и вторичные, при которых появлению полипов предшествуют воспалительные и язвенные процессы в толстой кишке.

W. Cripps в 1882 г. описал тотальный полипоз у двух членов (брата и сестры) одной семьи, что было первым сообщением о факте семейного накопления и предполагало генетическую обусловленность. R. Bickersteth в 1890 г. представил семью с пораженными родственниками в двух поколениях (мать и сын), что, в свою очередь, подтвердило наследование аденоматозного полипоза (АП). Т. Smith в 1887 г. упоминает о развитии аденокарциномы толстой кишки у одного из трех членов семьи, страдавших множественным полипозом.

Важным материалом для клинических и генетических исследований стал регистр семей с САП, основанный в госпитале Св. Марка в Лондоне в 1925 г. и включивший 1238 родственников с множественным полипозом из 510 семей. В последующем было показано, что САП является аутосомно-доминантным заболеванием, не сцепленным с полом, и характеризуется развитием множественных аденоматозных полипов и микроаденом в толстой кишке, которые при классическом фенотипе выявляются в юности или в третьей декаде жизни. Популяционная частота составляет 1:8000 новорожденных. В зависимости от числа полипов выделяют следующие формы заболевания:

- классическую или типичную форму (100–500 полипов) (рис. 4);
- диффузную форму, или тотальный полипоз (более 2000 полипов) (рис. 5);
- аттенуированную форму, или множественный полипоз (10–100 полипов).

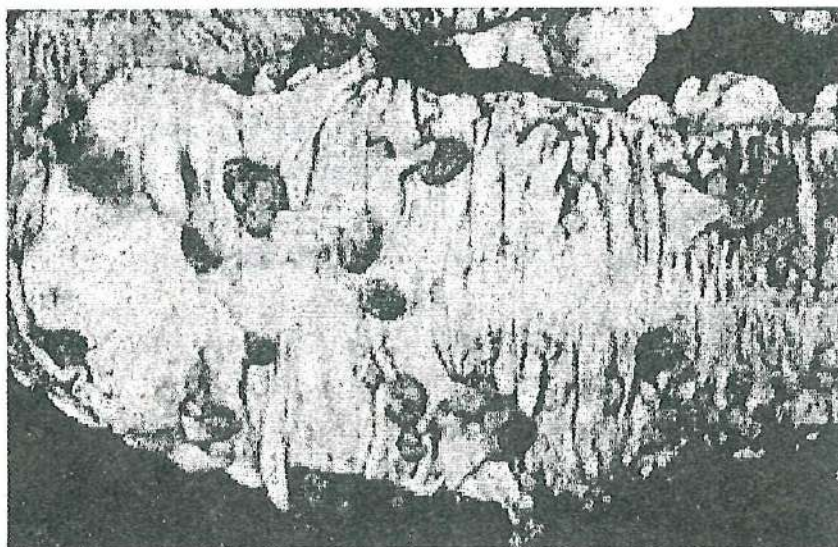


Рис. 4. Классическая форма диффузного семейного полипоза

НАСЛЕДСТВЕННЫЙ И СПОРАДИЧЕСКИЙ РАК ТОЛСТОЙ КИШКИ

Диффузный семейный полипоз

В то время как роль внешних факторов в формировании риска развития РТК продолжает обсуждаться, представления о наследственном компоненте в патогенезе опухолей толстой кишки стали носить вполне оформленный характер [16].

До 5 % РТК составляют наследственные раки, предрасположенность к которым передается по аутосомно-доминантному типу. Наследственные РТК ассоциированные синдромы подразделяются на 2 группы.

Первую составляет так называемый семейный полипоз толстой кишки – *familial adenomatous polyposis* (FAP) (рис. 3). Он проявляется возникновением сотен полипов толстой кишки, некоторые из которых неминуемо трансформируются в злокачественную опухоль.

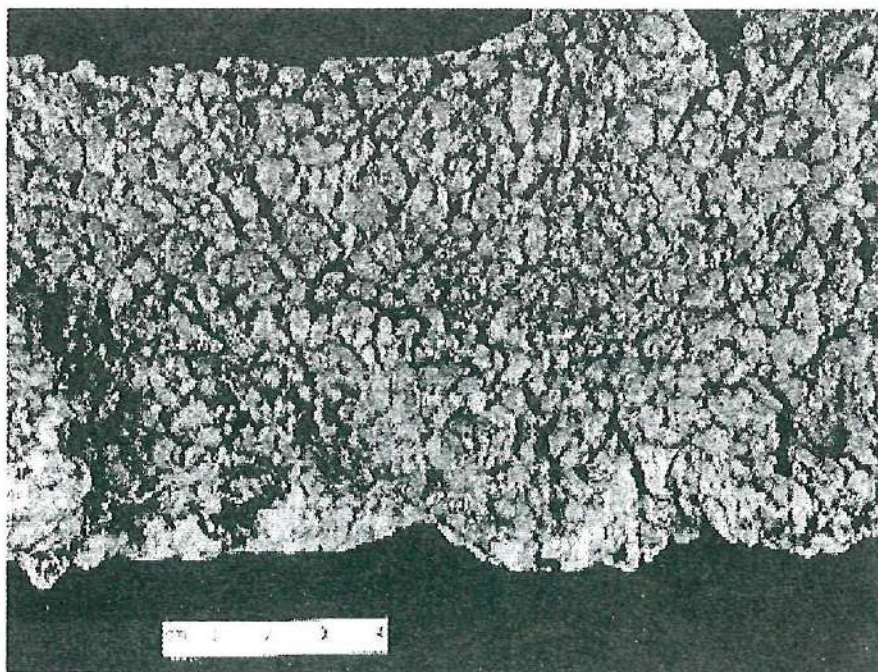


Рис. 3. Участок ободочной кишки, пораженный диффузным семейным полипозом

FAP-синдром чаще всего сопряжен с мутацией в гене *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), хотя сходные по клинической картине проявления могут вызываться повреждениями некоторых других генов, например *Mutation Y Homologue* (MYH).

Детальная характеристика семейного аденоматозного полипоза (САП) была представлена Н. Bussey в 1990 г. [6], хотя первое описание пациента с большим числом полипов в желудочно-кишечном тракте датировано 1721 г. (Menzelio D.).

Спектр мутаций APC очень широк и не содержит каких-либо определяющих, так называемых «горячих» точек. С другой стороны, спектр МҮН мутаций менее гетерогенен, и их частота имеет популяционную зависимость: Y165C и G382D варианты характерны для кавказской популяции: их частота составляет 75 %. В некоторых семьях выявлено сочетание МҮН-мутаций и гоносомального APC-мозаицизма, что, в свою очередь, может являться модификатором риска.

Риск развития САП и РТК у носителей мутаций гена APC близок к 100 %. Опухоли других локализаций (желудка, тела матки, щитовидной железы, молочной железы, центральной нервной системы, а также первично множественные злокачественные новообразования) могут возникать у 75 % пациентов носителей. Существует тесная взаимосвязь между генетическим дефектом и клиническими проявлениями болезни, что имеет большое значение для индивидуального подхода к диагностике, лечению и профилактике.

Большинство тяжелых вариантов САП, включая диффузный и множественный полипоз, синдром Гарднера и РТК, ассоциированы с мутациями в кодонах 1250 1464. Мутации в кодоне 1309, несмотря на внутрисемейную вариабельность, чаще вызывают тяжелую форму болезни с ранним началом заболевания, появлением тысяч полипов и развитием рака на 10 лет раньше, чем при других мутациях [5].

Аттенуированный (множественный) полипоз с небольшим числом полипов и более благоприятное течение болезни обусловлены мутациями в 5" и 3" концевых зонах или на участке альтернативного сплайсинга 9-го экзона гена APC [7].

МҮН-мутации выявлены только у пациентов с классическим и множественным полипозом и у больных с единичными полипами. В семьях, где не прослеживается вертикальное наследование и отсутствуют мутации гена APC, биаллельные МҮН-мутации являются причиной развития единичных полипов двенадцатиперстной кишки и рака желудка в очень молодом возрасте (25 % случаев), что необходимо учитывать при наблюдении пациентов носителей МҮН патологического генотипа.

Наследственный неполипозный колоректальный рак

Вторая группа наследственных РТК ассоциирована с так называемым синдромом наследственного неполипозного рака толстой кишки – *hereditary non polyposis colorectal cancer* (HNPCC); HNPCC-синдрому присуще существование фенокопий, то есть наличие нескольких генов (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS2), мутация в которых вызывает идентичные фенотипические отклонения. Все перечисленные гены отвечают за «мисматч» репарацию ДНК; их инактивация проявляется картиной так называемой «микросателлитной нестабильности». Большинство РТК возникает спорадически. Предполагается, что риск спорадического РТК может модифици-

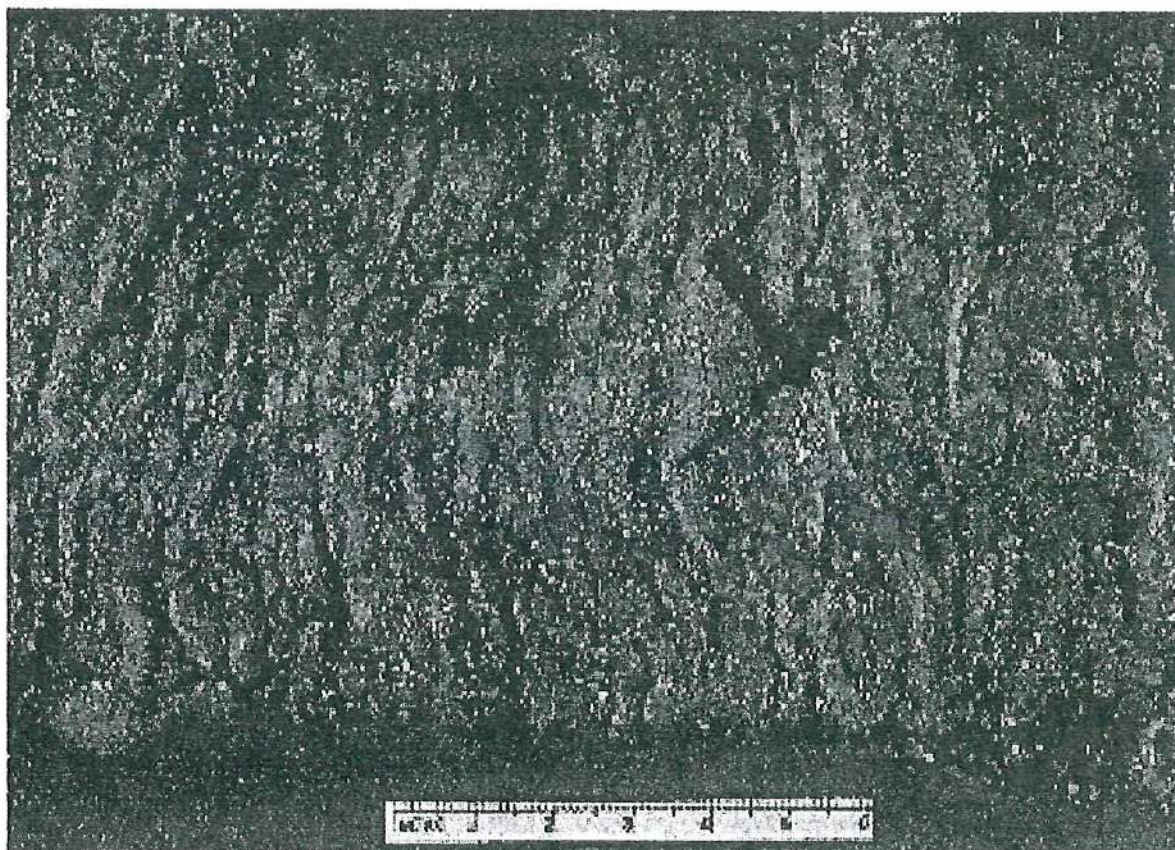


Рис. 5. Диффузная форма семейного полипоза

Средний возраст развития РТК на фоне САП составляет 30–35 лет, что на 30 лет раньше, чем в общей популяции; у 5 % пациентов озлокачествление полипов происходит к 20-летнему возрасту. Семейный аденоматозный полипоз стал первым заболеванием, ассоциированным с РТК, для которого был идентифицирован ген предрасположенности APC, являющийся доминирующим этиологическим фактором в развитии этой патологии. Анализ сцепления в семьях с САП позволил картировать ген APC на участке 5q21 и показал, что ген содержит 15 экзонов (8535 нуклеотидных пар) и кодирует белок с молекулярной массой 310 кДа, состоящий из 2843 аминокислотных остатков [15].

Основная часть как наследуемых, так и соматических мутаций ассоциирована с 15-м экзоном, составляющим 75 % кодирующей последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) гена APC. Функциональная значимость мутаций APC связана с ключевой ролью этого гена в регуляции клеточного деления эпителия толстой кишки и других тканей.

Структурные перестройки в гене APC выявляют в 95 % случаев классического САП (более 500 вариантов). Частота герминальных мутаций составляет 50–70 %. Доля мутаций *de novo*, по данным разных авторов, колеблется от 7 до 25 %. Кроме того, в семьях, где САП не сцеплен с локусом 5q21, геномный скрининг позволил идентифицировать на хромосоме 1p32 34 ген МУН, ассоциированный с аутосомно-рецессивной формой семейного полипоза.

Сочетание злокачественных новообразований женской репродуктивной системы и желудочно-кишечного тракта в семейном анамнезе пробанда также подтверждает синдромальную патологию. Начало молекулярных исследований при НКРП относится к 1993 г., когда были произведены анализ генетической связи и идентификация локусов на 2p- и 3p-хромосомах, ассоциированных с генами предрасположенности к РТК. Герминальные гетерозиготные мутации генов, ответственных за ошибки репарации ДНК (mismatch repair 2– MMR), – MSH2, MLH1, MSH3, MSH6 (GTBP), PMS1, PMS2 в сочетании с микросателлитной нестабильностью являются причиной возникновения НКРП. Опухоль обычно зарождается при соматической мутации аллеля дикого типа, инактивирующей систему MMR и повышающей уровень микросателлитной нестабильности, играющей ведущую роль в инициации и прогрессии опухолевого роста.

Частота выявления мутаций зависит от критериев, применяемых при постановке генетического диагноза, и колеблется от 10 до 80 %. Основная часть мутаций (около 90 %) при НКРП выявлена в генах MLH1 и MSH2: в международной базе данных зарегистрированы 126 различных вариантов. Ген MSH2 включает 16 экзонов, 935 кодонов (171925 нуклеотидных пар) и кодирует белок, состоящий из 934 аминокислотных остатков. Ген MLH1 представлен 19 экзонами, 757 кодонами (57358 нуклеотидных пар), кодирует белок из 756 аминокислот. Большинство мутаций локализуются во внутригенной или интронной областях.

В семьях, где, помимо РТК, прослеживается накопление рака тела матки, герминальные мутации гена MSH6 обуславливают развитие заболеваний в 10 % случаев. Полагают, что MSH6-ассоциированная предрасположенность реализуется в атипичном течении и доброкачественных формах синдрома Линча. К тестированию других генов прибегают при отсутствии мутаций в генах MLH1 и MSH2. Описаны только 5 мутаций генов PMS1 и PMS2.

Генетические синдромы

Синдром Гарднера–Тернера – полипоза ободочной и прямой кишки в сочетании с доброкачественными опухолями костей, мягких тканей и кожи.

Синдром Пейтца–Джигерса характеризуется полипозом всего желудочно-кишечного тракта с пигментацией губ и щек.

Болезнь Тюрка (синдром Тюрко) проявляется диффузным полипозом толстой кишки и опухолями центральной нервной системы.

Синдром Коудена – редкое аутосомно-доминантное заболевание (1:200 000) с 90 %-й пенетрантностью. На фоне множественных доброкачественных опухолей, таких как гамартромы, папилломы, аденомы, фиброаденомы, часто развиваются РТК (60 %), рак молочной железы (50 %), рак щитовидной железы (10 %) и рак тела матки (8 %). Герминальные мутации гена-супрессора PTEN (10q23) выявляют у 80 % пациентов с клиническим диагнозом.

роваться нормальными вариациями генома – генными полиморфизмами. Однако многочисленные попытки обнаружить взаимосвязь между риском развития РТК и генетическим полиморфизмом систем метаболизма канцерогенов, репарации ДНК, контроля клеточного цикла и т.д. не привели к сколь либо значимым результатам [13].

История наследственного неполипозного рака, или синдрома Линча, начинается в 1895 г., когда патологоанатом из Мичиганского университета А. Warthin описал родословную семьи G., в которой родственники четырех поколений страдали раком толстой кишки, желудка, тела матки, яичников и молочной железы. В дальнейшем Н. Lynch в 1966 г. описал сходные клинико-генетические признаки в двух семьях. Спустя 40 лет, благодаря развитию молекулярных технологий, в семье G. была идентифицирована герминальная мутация гена MSH2, что подтвердило наследственную этиологию синдрома. Сегодня ННКРР, известный также как синдром Линча, – частая наследственная форма РТК с аутосомно-доминантным типом наследования, характеризующаяся развитием РТК в нескольких поколениях, молодым (до 45 лет) возрастом начала болезни, преимущественным поражением правосторонних отделов толстой кишки (в 70 % – проксимальный отдел и селезеночный угол), высокой частотой развития синхронных (0–6 месяцев после постановки первичного диагноза) и метакронных (более 6 месяцев) опухолей, а также возникновением других злокачественных новообразований: рака тела матки, рака яичников, рака желудка (преимущественно в странах Азии), рака молочной железы, рака поджелудочной железы (РПЖ), опухолей мозга и гепатобилиарной системы. Интересным оказался факт статистически значимого снижения риска развития рака легкого у членов семей с таким генетическим диагнозом.

У пациентов с ННКРР могут развиваться также аденомы и карциномы сальных желез, множественные кератоакантомы и опухоли брюшной полости – клинические признаки, ассоциированные с вариантом *Muir Torre*, в некоторых случаях выступающим дополнительным критерием для верификации диагноза синдрома Линча.

При постановке генетического диагноза ННКРР пользуются Амстердамскими критериями, предложенными в 1991 г. интернациональной исследовательской группой по изучению ННКРР:

- наличие в семейном анамнезе не менее трех родственников в двух поколениях, страдающих РТК;
- непременно условием является молодой (до 50 лет) возраст развития болезни у одного из родственников;
- наличие больных I степени родства; отсутствие полипов желудочно-кишечного тракта [21].

В 1996 г. дополнительные клинико-морфологические исследования, проведенные в Американском национальном институте рака (NCI Bethesda, USA), позволили разработать рекомендации для тестирования на микросателлитную нестабильность при выявлении пациентов с ННКРР [18].

ПАТОГЕНЕЗ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

Варианты молекулярного патогенеза спорадического рака толстой кишки

Интересной особенностью РТК является существование принципиально разных вариантов молекулярного патогенеза этого заболевания. Более 85 % РТК демонстрируют так называемую хромосомальную нестабильность – *chromosomal instability (CIN)*, выражающуюся в множественных делециях, амплификациях и перестройках больших участков хромосом. Подобное состояние генома характерно практически для всех новообразований, включая раки молочной железы, яичника, предстательной железы, желудка и т.д.

Центральное место в понимании биологии колоректального рака занимают клеточные генетические изменения, которые приводят к развитию рака: являются ли эти изменения альтерацией, связанные с наследственными мутациями, или приобретенными (также известны как соматические).

Механизмы возникновения хромосомальной нестабильности изучены плохо; одним из инициирующих звеньев может служить мутация в гене *BUB1*. Альтернативный вариант патогенеза РТК подразумевает упомянутую выше микросателлитную нестабильность (*microsatellite instability (MSI)*). Дезоксирибонуклеиновая кислота подобных опухолей содержит огромное количество микромутаций, поражающих моно-, ди- и тринуклеотидные повторы (*RER+, replication error phenotype*); в то же время структура хромосом в *MSI+* РТК остаётся достаточно интактной.

В последнее время стали выделять новый тип патогенеза РТК, который проявляется в избыточном метилировании так называемых CpG-островков (*CpG island methylator phenotype (CIMP)*). Обозначение CpG применяется для пар цитозин-гуанин, расположенных последовательно на одной и той же цепи ДНК. Цитозины, предшествующие гуанину, демонстрируют повышенную чувствительность к метилированию. Регуляторные (промоторные) области генов характеризуются накоплением большого количества CpG-пар. Если последние подвергаются метилированию, то происходит угнетение транскрипции соответствующего гена. *CIMP+* фенотип может ассоциироваться с *MSI+* фенотипом, так как нестабильность баланса метилирования зачастую приводит к инактивации гена *hMLH1* [4, 9].

Гены, вовлечённые в патогенез рака толстой кишки

Патогенез РТК включает как активацию онкогенов, так и инактивацию супрессорных генов (рис. 6). Примерно в половине РТК отмечаются мутации в «горячих» кодонах гена *KRAS*. Мутация *KRAS* препятствует отщеплению фосфатной группы от кофактора данного белка, гуанозин трифосфата, то есть нарушает механизм негативной ауторегуляции его активно-

Синдром Банайан–Рувалкаба (гамартроматоз, липоматоз, гемангиоматоз, микроцефалия и др.) также ассоциирован с молекулярной патологией гена PTEN, но с меньшим риском развития РТК и других злокачественных опухолей.

Синдром Олфилда – сочетание полипоза ободочной кишки с опухолями надпочечника, щитовидной железы, кистами сальных желез.

Синдром Конкрайт–Канада – пигментация кожи, атрофия ногтей, алопеция, гипопропротеинемия.

МЕРЫ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Для пациентов, имеющих патологический генотип, рекомендовано диспансерное наблюдение, включающее колоноскопию, начиная с 25–30-летнего возраста, и консультацию проктолога. Для женщин обследование должно быть дополнено интравагинальным ультразвуковым исследованием органов малого таза, маммографией, анализом уровня маркеров СА 125 и СА 153, консультациями маммолога и гинеколога с целью выявления злокачественных новообразований женской репродуктивной системы. Следует обращать особое внимание на жалобы пациентов с синдромальной наследственной патологией с учетом высокого риска развития неоплазий.

Профилактические подходы включают лекарственные и хирургические методы. У пациентов, страдающих САП, применение целекоксиба в дозе 400 мг 2 раза в день в течение 6 месяцев позволяет снизить число и рост полипов в среднем на 28 %, по сравнению с контрольной группой. Необходимо помнить, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов ведет к возврату и прогрессированию болезни. Регрессия аденом толстой кишки была отмечена у всех пациентов, принимающих сулиндак (200 мг в день) в течение 6 месяцев. Однако после прекращения приема, в среднем через 48 месяцев, число и размер полипов возрастали [20]. Многообещающие результаты у пациентов с наследственной патологией демонстрируют молекулярно таргетные лечебные подходы.

Из профилактических операций у пациентов с САП используют частичную колэктомию, у пациентов с синдромом Линча – субтотальную колэктомию и двустороннюю сальпингоовариозэктомию (после окончания периода деторождения). Показано, что проктоколэктомия полностью исключает риск развития метакронных опухолей у пациентов – носителей мутаций. Риск развития рака прямой кишки после субтотальной колэктомии колеблется от 3,4 до 10 %.

Показатели 5-летней выживаемости пациентов с ННКРР после выполнения профилактических операций составляют 98 %. Таким образом, клинико-генетические и молекулярно-биологические исследования семейных форм РТК позволяют разработать индивидуальный комплексный подход к верификации диагноза, оценке риска развития рака, ранней диагностике, лечению и профилактике с целью снижения заболеваемости и смертности.

K-ras. Мутации онкогена *K-ras* выявляются у 50 % больных sporadическим колоректальным раком. Белки *Ras*-семейства являются важнейшими регуляторами клеточной адгезии и клеточного цикла, участвуя в передаче различных сигналов.

Deleted in colorectal carcinogenesis (DCC) – опухолесупрессорный ген, название которого дословно переводится как «потерянный при колоректальном карциногенезе». Потеря данного гена обнаруживается более чем в 70 % случаев.

Smad4 – еще один опухолесупрессорный ген. Его потеря наблюдается у трети больных с колоректальным раком. Группа белков *Smad4* участвует в передаче сигналов трансформирующего фактора роста *b (TGF-b)*.

TGF-bR2 – рецептор трансформирующего фактора роста *b*. Последний обладает способностью ингибировать рост эпителия. Мутационные изменения этого рецептора обнаружены как при sporadическом, так и при наследственном колоректальном раке, а также при язвенном колите.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА И ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ЛЕЧЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Стадия заболевания и степень дифференцировки опухоли являются основными параметрами, определяющими тактику лечения и прогноз при раке толстой кишки. Однако даже в пределах клинически однородных групп пациентов РТК характеризуется высокой гетерогенностью течения и ответа на терапию; по-видимому, подобное разнообразие связано с тем, что под видом одного и того же морфологического типа опухолей скрываются несколько разновидностей заболевания, различающихся по своему молекулярному патогенезу. Предполагается, что знания о молекулярных вариантах РТК будут способствовать более рациональному осуществлению лечебных мероприятий.

Прогностические маркеры рака толстой кишки

Наиболее клинически апробированным молекулярным тестом является анализ опухоли на присутствие упомянутой выше микросателлитной нестабильности (RER+ фенотипа), которая ассоциирована с целым рядом клинически значимых признаков:

1) рак толстой кишки с микросателлитной нестабильностью отличаются неплохим прогнозом, так как высокая частота соматических мутаций способствует иммуногенности опухоли;

2) подобные новообразования чаще отвечают на терапию с применением фторпиримидинов, так как RER+ опухоли характеризуются сниженной способностью к компенсации повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты;

сти. В результате мутированный *KRAS* инициирует митогенный сигнал, что способствует безостановочному делению стволовых клеток кишечного эпителия. Наиболее известным супрессорным геном, вовлечённым в развитие РТК, является ген *p53*, отвечающий за стабильное состояние генома; при возникновении повреждений ДНК происходит активация *p53*, что в конечном счете приводит к суициду клетки хозяина – апоптозу. Инактивация гена *p53* позволяет клетке накапливать мутации, в том числе повреждения, которые активируют онкогены и инактивируют антионкогены.

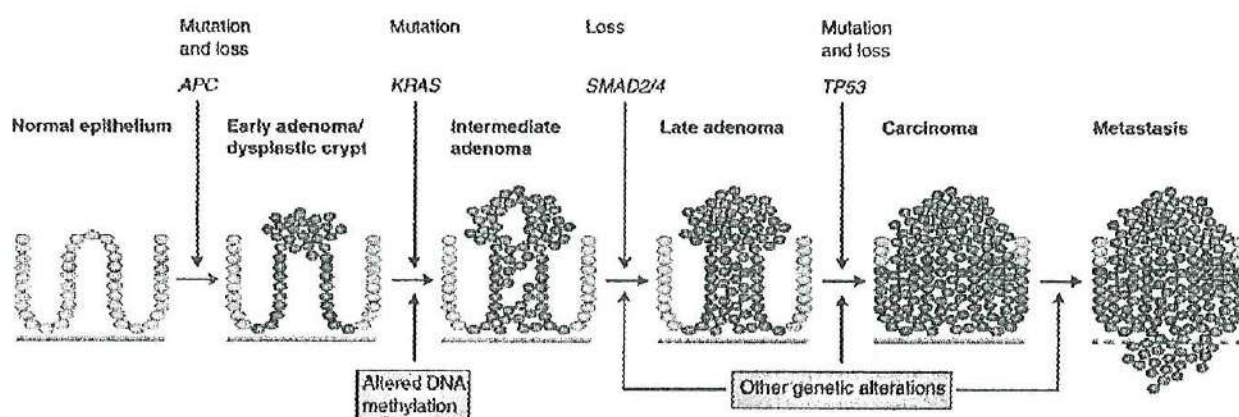


Рис. 6. Схема канцерогенеза при раке толстой кишки

Мутации в гене *p53*, как правило, носят «точковый» характер, хотя могут наблюдаться и его делеции. С инактивацией гена *p53* принято связывать частую встречаемость потерь гетерозиготности хромосомы 17p в РТК [8].

Другим характерным для РТК повреждением является инактивация гена *APC*, расположенного на хромосоме 5q. Ген *APC* участвует в процессах клеточной адгезии и является составляющей сигнального каскада *Wnt*. В РТК с интактным *APC* часто отмечается повреждение другого участника *Wnt*-каскада – гена бета-катенина. Перечисленные нарушения в итоге приводят к активации транскрипции ряда онкогенов, например *MYC* и *CCND1*. Делеции хромосомы 18q раньше связывали с инактивацией супрессорного гена *DCC*. За последнее время к генам-кандидатам, расположенным в этом регионе, прибавились *SMAD2* и *SMAD4* [10].

APC-ген (*adenomatous polyposis coli*). Его мутация встречается в 60–80 % случаев спорадического колоректального рака и 100 % случаев семейного полипоза и является ключевым звеном колоректального канцерогенеза.

COX-2–циклооксигеназа 2-го типа синтезируется в тканях под воздействием различных стимулов. При колоректальном раке в 90 % случаев отмечается повышенная экспрессия *COX-2* при нормальном уровне *COX-1*.

Маркеры чувствительности и резистентности к терапии

Наибольший практический интерес вызывают те молекулярные детерминанты, которые помогают оптимизировать выбор цитостатических и других лечебных препаратов.

Достаточно чёткая картина получена в отношении индивидуализации применения препаратов фторпиримидинового ряда. В частности, низкий внутриопухолевый уровень ключевого фермента инактивации 5-фторурацила – дигидропиримидин дегидрогеназы (*dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)*) является благоприятным фактором для применения данного препарата.

Механизм противоопухолевого действия 5-фторурацила (5-ФУ) связан с угнетением фермента тимидилат-синтетазы (TS). Активный метаболит 5-ФУ, 5-фтор-2'-дезоксинуридин-монофосфат (FdUMP), взаимодействует с TS в присутствии кофактора, 5,10- метилен-тетрагидрофолат (CH₂ FH₄), образуя тройной комплекс, что в итоге приводит к блокированию *de novo* синтеза дезокситимидинмонофосфата, являющегося одним из предшественников ДНК. В результате этих сложных биохимических процессов прекращается синтез новых молекул ДНК в ядре опухолевой клетки, что приводит к ее гибели. Разрушение 5-ФУ до уровня фторпиримидиновых нуклеотидов осуществляется в основном в печени под действием фермента дигидропиримидин дегидрогеназы, уровень которого обуславливает токсичность 5-ФУ. Нормальная активность DPD наблюдается у 95 % населения, у 3–5 % – функция DPD снижена, а у 0,1 % отсутствует полностью. Полный дефицит DPD может быть ассоциирован с церебральной дисфункцией. Пониженная активность DPD не сопровождается какими-либо клиническими проявлениями, однако при лечении 5-ФУ подобные пациенты могут испытывать тяжелейшие токсические реакции. Многие, хотя далеко не все, случаи дефицита DPD объясняются инактивирующей мутацией в соответствующем гене. К сожалению, мутации DPD могут располагаться в любой части гена, поэтому для проведения молекулярного анализа требуется полное секвенирование гена.

В то же время примерно у 0,5 % людей наблюдается наследственный дефект данного гена; у подобных индивидуумов назначение обычных терапевтических доз фторпиримидинов сопровождается тяжелейшими осложнениями. Другой фермент, тимидилатсинтаза (*thymidylate synthase (TS)*), является главной молекулярной мишенью 5-фторурацила. Представляется, что повышенное содержание TS может препятствовать «насыщению» терапевтической мишени и коррелирует с низкой эффективностью лечения.

Многочисленными исследованиями установлена четкая связь между уровнем экспрессии TS в опухоли и ответом на лечение 5-ФУ: эффективность терапии фторпиримидинами обратно пропорциональна величине TS. С. Leichman et al. в 1997 г. показал, что в группе больных колоректальным раком с низким значением TS объективный ответ был достигнут у

3) присутствие микросателлитной нестабильности указывает на высокий риск появления независимого, первично множественного новообразования, так как RER+ фенотип зачастую является признаком синдрома наследственного неполипозного рака толстой кишки.

Существенно, что тест на микросателлитную нестабильность относительно прост, доступен и может быть выполнен на ретроспективном (архивном) биологическом материале.

Опубликованы десятки работ, посвящённых ассоциациям между прогнозом РТК и молекулярными характеристиками опухоли. Считается, что делеции длинного плеча хромосомы 18 свидетельствуют о высоком риске рецидива и метастазирования. По крайней мере отчасти подобная закономерность связана с утратой экспрессии антионкогена DCC, расположенного в локусе 18q21. Неблагоприятная прогностическая значимость была также зарегистрирована для делеций хромосом 1p, 6p, 9p и 14q. Предполагается, что агрессивность РТК может коррелировать не столько с отдельными цитогенетическими аномалиями, сколько с общим числом хромосомных делеций, то есть со степенью разбалансированности генома [17].

В некоторых исследованиях установлено неблагоприятное прогностическое значение точковых мутаций в онкогене KRAS. Аналогичные данные были опубликованы и для гена p53. В литературе имеются попытки связать клинические особенности РТК с экспрессией мембранных тирозинкиназ – рецептором эпидермального фактора роста *EGFR (ERBB1/HER1)* и его гомологом *ERBB2/HER2*. В отдельных работах наблюдалась взаимосвязь между экспрессией антиапоптотического белка *bcl2* и относительно благополучным течением заболевания. Исследования, посвящённые клинической значимости амплификации и экспрессии онкогена с *tus*, дали взаимоисключающие результаты.

Особую группу составляют гены, отвечающие за процессы ангиогенеза, инвазии и метастазирования. В частности, перечисленным свойствам неопластического роста способствует продукция опухолевыми клетками так называемых матриксных металлопротеиназ (*matrix metalloproteinases (MMPs)*). Для прогноза РТК продемонстрировано неблагоприятное значение экспрессии *MMP1*, *MMP2* и *MMP9*. Сходные ассоциации были обнаружены для протеазы другого семейства – (urokinase type plasminogen activator (*uPA*)). К наиболее известным маркерам метастазирования относится гликопротеин CD44, выполняющий адгезивные функции и, по-видимому, способствующий закреплению опухолевых клеток в анатомически отдалённых органах и тканях [14].

Предполагается, что присутствие в опухоли неблагоприятных молекулярных характеристик говорит о целесообразности применения более активной тактики лечения, например адьювантной химиотерапии в случае РТК ранних стадий. Однако клиническая эффективность подобного подхода вовсе не является очевидной: действительно, выявление того или иного прогностического маркера само по себе не позволяет предсказывать ответ опухоли на лечение.

инфузия 5-ФУ. И, наконец, предиктивная значимость TS зависит от того, назначаются ли фторпиримидины в качестве монотерапии или в комбинации с другими цитостатиками.

Рядом исследователей на сегодняшний день доказана предиктивная значимость ферментов DPD и тимидилат-фосфорилазы (*thymidylate phosphorylase (TP)*). Низкое содержание DPD коррелирует с чувствительностью опухоли к фторпиримидинам. Экспрессия DPD может снижаться в процессе злокачественной трансформации, что создаёт определённое «терапевтическое окно» для действия фторурацила и его производных.

Фермент TP не только участвует в метаболизме азотистых оснований ДНК, но и способствует процессам сосудобразования, так как по структуре и функции идентичен тумор-ассоциированному фактору ангиогенеза и тромбоцитарному эндотелиальному фактору роста. Высокий уровень экспрессии TP отмечается при многих солидных опухолях: раке молочной железы (РМЖ), колоректальном раке, раке желудка, мочевого пузыря, яичников, почек – и коррелирует с неблагоприятным прогнозом и низким ответом на стандартную 5-ФУ, содержащую химиотерапию. В то же время высокая экспрессия TP может свидетельствовать о чувствительности опухоли к пероральным фторпиримидинам, в частности к капецитабину, так как именно TP конвертирует капецитабин в активную форму. Таким образом, высокая внутриопухолевая активность TP может, с одной стороны, способствовать прогрессии онкологического заболевания, а с другой – избирательности действия пероральных форм фторпиримидинов.

Следует отметить, что успешное назначение фторпиримидинов зависит скорее не от одного какого-либо параметра, а от комбинации нескольких маркеров. Так, чувствительность к капецитабину определяется низким уровнем DPD и TS, высоким уровнем TP. Комбинация низкого уровня DPD и низкого уровня TS определяет чувствительность опухоли к 5-ФУ.

Последнее утверждение доказано результатами первого проспективного исследования С. Smorenburg et al. в 2006 г. В исследование включено 58 ранее не леченных пациентов с диссеминированной формой рака толстой кишки. Выбор химиотерапии первой линии основывался на молекулярном анализе опухоли: больным с низкой экспрессией TS и DPD назначался 5-ФУ с лейковорином, при прогрессировании – комбинация оксалиплатина и иринотекана. В группе В больным с повышенным уровнем TS и/или DPD проводилась перекрестная с группой А химиотерапия: в начале комбинация оксалиплатина и иринотекана, а при прогрессировании – 5-ФУ с лейковорином. Частота объективного ответа в первой группе оказалась в 2 раза выше и составила 35 %.

К сожалению, результаты исследования не подтвердили высокую эффективность (до 70 %) химиотерапии фторпиримидинами при низком уровне DPD и TS, доказанную ретроспективными испытаниями. Авторами исследования высказано мнение о необходимости проведения рандомизированных исследований по изучению предиктивных маркеров на больших популяциях.

50 % пациентов, в то время как при высокой экспрессии этого энзима только в 5% случаев. Аналогичная зависимость между низким уровнем TS и эффективностью химиотерапии 5-ФУ была подтверждена С. Aschele в 2002 г. Частота объективных ответов, время до прогрессирования и общая выживаемость больных были выше при низком уровне TS. Заслуживает внимание исследование Y. Shirota et al. в 2001 г., в котором установлено, что оксалиплатин может снижать уровень внутриопухолевой активности TS. Данный факт объясняет высокую эффективность комбинации FOLFOX у больных метастатическим РТК, ранее получавших химиотерапию в режиме 5-ФУ+лейковарин (ЛВ).

Следовательно, использование оксалиплатина в сочетании с 5-ФУ позволяет преодолеть химиорезистентность, вызванную гиперэкспрессией TS.

В исследованиях А. Paradiso в 2001 г. было обнаружено, что высокая концентрация TS в ткани рака толстой кишки коррелирует с противоопухолевой активностью иринотекана.

Таким образом, уровень экспрессии TS может рассматриваться не только молекулярным маркером, прогнозирующим эффективность терапии фторпиримидинами, но и фактором, способствующим правильному выбору цитостатика.

Однако имеющиеся разногласия по поводу значимости TS как маркера чувствительности к химиотерапии фторпиримидинами небесспорны: не у всех больных с низким уровнем экспрессии TS отмечается выраженный терапевтический ответ. Причиной этого может быть наличие других генов в опухолевых клетках, определяющих ответ на 5-ФУ и его производные.

Следует отметить, что уровень TS не является постоянной величиной, его значение в первичной и метастатической опухоли различно. Поэтому при выборе тактики лечения распространенных форм опухоли предпочтительнее проводить анализ метастатической ткани. J. Libra et al. в 2004 г. показано, что уровень экспрессии TS может увеличиваться и в процессе лечения фторпиримидинами; предполагается, что активация транскрипции гена TS является одним из механизмов приобретённой резистентности к 5-ФУ.

Кроме того, прогностическая значимость статуса TS зависит от множества обстоятельств клинического характера. В частности, в то время как при метастатическом распространении онкологического процесса улучшенные результаты лечения фторпиримидинами наблюдаются у больных с пониженным содержанием TS, обратная закономерность отмечается в отношении тех пациентов, которые проходят адъювантное лечение теми же препаратами.

Подобное противоречие принято объяснять фундаментальными биологическими различиями между сформировавшимся макроскопическим метастатическим очагом и единичными опухолевыми клетками. Примечательно, что избыток TS может быть компенсирован локальной доставкой цитостатика. В частности, при метастазах печени, экспрессирующих значительное количество TS, рекомендуется внутривенная артериальная

Подобная концепция использования препаратов нового поколения подкрепляется опытом применения ингибиторов эстрогенового сигнального каскада (тамоксифен) и рецептора HER2 (герцептин) при лечении рака молочной железы.

В настоящее время проводятся десятки исследований, направленных на оценку эффективности ингибиторов рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ, фарнезилтрансфераз, циклооксигеназы 2 и т. д. при лечении РТК; предполагается, что решение о применении данных терапевтических субстанций будет основываться не на эмпирических или статистических соображениях, а на результатах анализа экспрессии соответствующих мишеней в опухолевой ткани.

Лабораторные методы

Вопреки общепринятому мнению, многие из методов молекулярно-биологического анализа опухолей представляются вполне доступными для применения в условиях повседневной клинической работы. Для оценки некоторых из перечисленных выше маркеров допустимо использование нескольких альтернативных подходов.

В частности, исследование экспрессии тех или иных ферментов может осуществляться как при помощи иммуногистохимии, так и посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) детекции соответствующих транскриптов. В первом случае тест может выполняться в условиях обычной патоморфологической лаборатории.

Недостатком иммуногистохимии является её полуколичественный характер, а также необходимость использования весьма дорогостоящего и не всегда доступного компонента – специфических антител.

Для применения ПЦР в режиме реального времени требуется более сложное оборудование (в частности, прибор для мониторинга ПЦР в режиме реального времени), однако к преимуществам метода следует отнести, прежде всего, его универсальность: в отличие от длительного процесса создания новых антител, специфические олигонуклеотиды могут быть синтезированы для любой молекулы в течение нескольких дней.

В последнее время стали часто упоминаться принципиально новые технологии, подразумевающие комплексную, одновременную оценку всех элементов генома. В частности, микрочиповые подходы к идентификации «экспрессионных профилей» новообразований позволили выявить несколько десятков потенциальных маркеров прогноза и химиочувствительности опухолей. Хотя приоритет подобных методов в процессе идентификации новых клинически значимых молекул представляется абсолютно неоспоримым, следует подчеркнуть, что микрочипы не могут применяться в рутинной диагностике ввиду огромной стоимости, низкой чувствительности и полуколичественного характера измерений.

Механизм внутриопухолевой конверсии препарата Кселода в активный фторпиримидин связан с повышенной экспрессией в новообразованиях фермента тимидилат фосфорилазы. Если уровень TP низок, то назначение кселода представляется нецелесообразным, хотя подобные опухоли характеризуются лучшим ответом на «классические» фторпиримидины, в частности на 5-фторурацил.

В настоящее время интенсивно апробируются другие маркеры химиочувствительности РТК, например ERCC1 (оксалиплатин), топоизомераза I (иринотекан) и т.д.

Иринотекан (кампто СРТ-11) представляет собой полусинтетический аналог растительного алкалоида камптотецина. В основе механизма противоопухолевого действия иринотекана лежит его способность блокировать фермент-топоизомеразу I, которая участвует в процессе репликации и транскрипции ДНК, разворачивая для этого на время двухнитевую спираль ДНК. Связываясь с топоизомеразой I, иринотекан стабилизирует ДНК в развернутом состоянии, что приводит к ее разрывам. В печени иринотекан превращается в активный метаболит 7-этил-10-гидроксикамптотецина (SN-38), обладающий в 1000 раз большим сродством к ферменту, чем сам иринотекан. SN-38 выделяется с желчью и, всасываясь из кишечника обратно в кровь, также «работает» как ингибитор топоизомеразы.

Физиологическая инактивация SN-38 осуществляется посредством глюкуронидации, выполняемой ферментом уридин-дифосфат-глюкуронозил-трансферазой 1A1 (UGT1A1). Один из полиморфизмов фермента UGT1A1 заключается в вариабельности количества TA повторов в промоторной области гена. Большинство людей гомозиготны по аллелю (TA)6, ассоциированному с нормальной экспрессией UGT1A1. Некоторые индивидуумы гетеро- или гомозиготны по варианту (TA)7 (UGT1A1*28), который характеризуется сниженной транскрипцией гена (5–20 % людей). В то время как аллель UGT1A1*28 характерен преимущественно для представителей белой расы, у азиатов низкоактивный вариант UGT1A1 связан с полиморфизмом G211A (Gly71Arg).

Большинство исследователей сходятся на том, что присутствие вариантных аллелей гена UGT1A1 сопряжено с повышенной токсичностью иринотекана. Воспроизводимость подобных наблюдений привела к тому, что тест на полиморфизм UGT1A1 получил поддержку FOAD and Drug Administration (FDA). Для пациентов, которые гомозиготны по аллелю UGT1A1*28, рекомендуется снижение стартовой дозировки препарата. В то же время многие специалисты обсуждают целесообразность увеличения дозы иринотекана у носителей нормального генотипа UGT1A1. Выявление аллеля UGT1A1*28 возможно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-теста) в специализированном учреждении.

Особую группу маркеров составляют молекулы мишени. По определению терапевтическая эффективность лекарственных средств, созданных для специфического поражения того или иного фермента, определяется, прежде всего, представленностью данного белка в опухолевой ткани.

В качестве основных мишеней целенаправленной терапии могут выступать многочисленные элементы сигнальных путей, связанные с регуляцией клеточного цикла и апоптоза, нарушение которых ассоциировано со злокачественным ростом.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или HER1, – трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 kD, обладающий тирозинкиназной активностью, является наиболее хорошо изученной мишенью; EGFR экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки.

Epidermal growth receptor состоит из трех участков: внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного гидрофобного участка и внутриклеточного тирозинкиназного домена. В роли лигандов выступают экскретируемые нормальными и/или опухолевыми клетками ростовые факторы *epidermal growth factor (EGF)* и *transforming growth factor- α (TGF- α)*, которые аутокринным и/или паракринным путем регулируют активность рецептора. Активация EGFR происходит после связывания одного из специфических лигандов с внеклеточным доменом, последовательных конформационных изменений в виде гомо- или гетеродимеризации рецептора и реакции фосфорилирования тирозиновых остатков внутриклеточного домена, что приводит к значительному усилению внутриклеточных сигнальных импульсов.

В результате всех этих взаимодействий активированная тирозинкиназа через специальные белки запускает целый каскад внутриклеточных процессов, передающих импульс к ядру клетки, тем самым инициируя клеточную пролиферацию и ряд других биологических эффектов, ответственных за опухолевую прогрессию: адгезию и инвазию трансформированных клеток, включение антиапоптотических механизмов. Более того, лиганды EGFR – TGF- α и EGF могут индуцировать процессы опухолевого ангиогенеза за счет гиперэкспрессии васкулярного эндотелиального фактора роста (*vascular endothelium growth factor (VEGF)*).

Основные механизмы активации EGFR-зависимых сигнальных путей в опухолевых клетках обеспечиваются:

- 1) мутацией тирозинкиназного домена гена EGFR и, как следствие, его аутоактивацией при отсутствии факторов роста, приводящей к неконтролируемой пролиферации;
- 2) гиперэкспрессией EGFR;
- 3) избыточной продукцией факторов роста – лигандов EGFR (TGF- α , EGF).

Epidermal growth receptor активирован во многих опухолях человека: раке лёгкого, колоректальном раке, плоскоклеточном раке головы и шеи, раке молочной железы, меланомах и др. Существует несколько вариантов блокирования онкогенного эффекта, реализуемого через активированный EGFR:

Моноклональные антитела. Неспецифичность воздействия химиотерапии на опухолевые и здоровые клетки обуславливает ее высокую токсичность и непредсказуемость эффектов. В последние годы активно развивается так называемая целевая (*target*) терапия злокачественных опухолей. В ее основе лежит точечное воздействие на определенные клеточные рецепторы или сигнальные пути, передающие информацию в ядро клетки. Наиболее перспективными мишенями представляются рецепторы ростовых факторов – эпидермального фактора роста (*Epidermal growth receptor (EGFR)*) и сосудистого эндотелиального фактора роста (*Vascular endothelial factor (VEGF)*) которые достаточно часто гиперэкспрессируются в опухолях.

В настоящее время три таких препарата зарегистрированы для лечения рака толстой кишки: Цетуксимаб, Панитумумаб и Бевацизумаб.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА EGFR КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Epidermal growth receptor входит в состав семейства трансмембранных рецепторов HER, в котором также находятся HER2/neu, HER3 и HER4. Факторами (лигандами), активирующими EGFR, являются трансформирующий фактор роста альфа, эпидермальный фактор роста, амфирегулин и эфирегулин.

После взаимодействия лиганда с EGFR происходит его гомо- или гетеродимеризация, что приводит к аутофосфорилированию ряда тирозинкиназ. Далее сигналы каскадно передаются в ядро клетки, регулируя клеточный рост, пролиферацию, ангиогенез, инвазию и метастазирование (рис. 7).

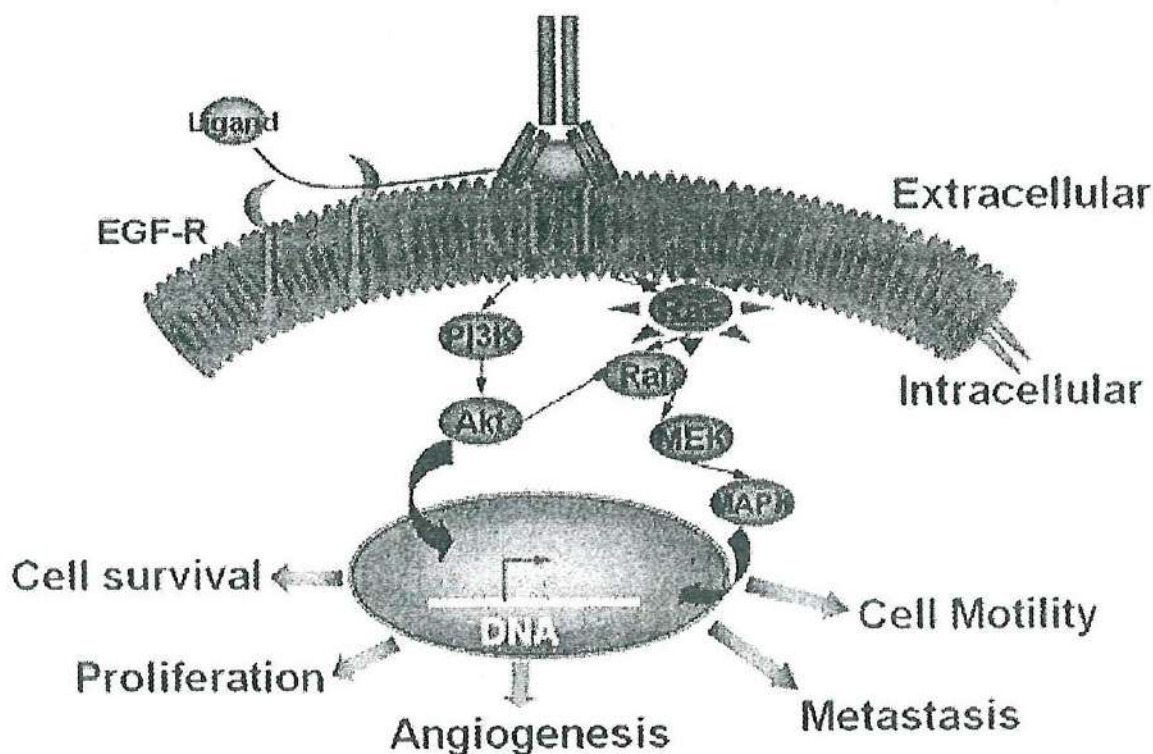


Рис. 7. Роль EGFR в канцерогенезе

Доказано, что активация генов семейства Ras за счет мутаций сводит на нет эффект ингибирования EGFR моноклональными антителами при терапии РТК.

Мутации в гене KRAS в опухолях толстой кишки встречаются в 30–60 % случаев. Наиболее часто мутации KRAS определяются в экзоне 2, кодонах 12 и 13. Однако описаны мутации в экзоне 3, кодоне 61 и в экзоне 4, кодонах 117 и 146. Мутации в гене NRAS (в идентичных экзонах и кодонах) при КРР составляют до 5 %. Мутации в гене HRAS при аденокарциноме толстой кишки не описаны. Самым изученным биомаркером в таргетной анти-EGFR-терапии пациентов с метастатическим РТК является статус мутаций кодонов 12 и 13 гена KRAS.

Наличие мутантных аллелей гена KRAS является независимым предсказательным маркером эффективности терапии ингибиторами EGFR. Поэтому моноклональные антитела назначают только больным метастатическим РТК с диким типом гена KRAS.

Предиктивное значение мутаций в разных генах семейства RAS неодинаково, и отсутствие результатов крупных проспективных рандомизированных исследований пока не позволяет применять дифференцированный подход при обнаружении разных видов мутаций. Так, опубликованы данные о зависимости эффективности лечения метастатического колоректального рака от статуса мутации KRAS. У пациентов с G13D-мутацией цетуксимаб в сочетании с химиотерапией достоверно улучшал, по сравнению с химиотерапией, частоту ответов и выживаемость без прогрессирования. У пациентов с G12V и другими типами мутаций подобных отличий не выявлено. Влияние мутаций гена NRAS и BRAF на эффективность таргетной терапии анти-EGFR моноклональными антителами (панитумумаб) изучалось у пациентов с метастатическим РТК, и было показано их негативное влияние на результаты лечения.

Активация мутированного пути Ras проявляется в том, что активированный K-Ras приводит к гиперпролиферации, а активированный NRAS подавляет апоптоз, что полностью нивелирует терапевтический эффект антител.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Определение статуса K-ras гена пациентов Иркутской области, страдающих колоректальным раком

Цель настоящего исследования – изучение частоты мутаций гена K-ras в аденокарциномах толстой кишки у жителей Иркутской области.

Работа выполнена на базе государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Иркутский областной онкологический диспансер» в онкологическом отделении хирургических методов лечения – колопроктологическое.

1) использование низкомолекулярных ингибиторов, способных воздействовать на внутриклеточный, несущий мутацию домен EGFR, и прерывать процесс тирозинкиназного фосфорилирования;

2) применение рекомбинантных пептидных лигандов EGF и/или TGF- α , конъюгированных с проникающими внутрь клетки цитотоксинами;

3) использование моноклональных антител, связывающих экстрацеллюлярный участок рецептора или образующих неактивный комплекс с его лигандами EGF и TGF- α .

В настоящее время к клиническому применению разрешены 9 ингибиторов передачи сигнала в клетки (иматиниб, сунитиниб, сорафениб, латиниб, гефитиниб, эрлотиниб, дазатиниб, нилотиниб, пазопаниб) и 5 моноклональных антител (трастузумаб, ритуксимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, панитумумаб).

Моноклональные антитела против EGFR в таргетной терапии

Другой путь активации EGFR-зависимых сигнальных путей в опухолевых клетках обусловлен гиперэкспрессией гена EGFR за счет амплификации его локуса. Подобная амплификация локуса EGFR отмечается при колоректальном раке и плоскоклеточных опухолях головы и шеи. Гиперэкспрессия EGFR опухолевыми клетками, как правило, ассоциируется с поздними стадиями и метастатическим фенотипом заболевания и, соответственно, коррелирует с плохим прогнозом [1].

Моноклональные антитела (*Mab*) к рецепторам EGFR-семейства блокируют рецептор, прикрепляясь к его внеклеточному домену, и конкурируют при этом с естественными лигандами – факторами роста EGF, TGF- α и др. В этих условиях стимуляции рецептора и инициации дальнейшей передачи сигнала внутрь клетки не происходит, а рецептор подвергается деградации.

Цетуксимаб (Эрбитукс) – химерное моноклональное антитело, специфичное к EGFR, уже одобрено к клиническому использованию у больных метастатическим колоректальным раком (мКРР), резистентным к химиотерапии иринотеканом, а также у пациентов с опухолями головы и шеи в комбинации с лучевой терапией [2]. При мКРР происходит активация EGFR-RAS/MAPK сигнального пути. В Ras-зависимом сигнальном пути ключевую роль играют белки семейства Ras.

Суперсемейство Ras включает H-Ras, K-Ras, N-Ras гомологичные белки. Прикрепленные к внутренней стороне клеточной мембраны белки Ras являются первыми членами каскада киназ, которые приводят к активации тирозинкиназных сигнальных путей с последующей транскрипцией генов.

В настоящее время проведено значительное количество исследований, доказывающих эффективность таргетной терапии моноклональными антителами против рецепторов эпидермального фактора роста опухоли при лечении метастатического колоректального рака как в монорежиме, так и в комплексе с химиотерапией.

Приведенные данные позволяют использовать таргетную терапию при предоперационном лечении местнораспространенных форм нижнеампулярного рака прямой кишки в сочетании с пролонгированным курсом лучевой терапией при обязательном условии наличия дикого типа онкогена K-ras и N-ras.

Цель работы заключалась в представлении клинического случая успешного лечения метастатического нижнеампулярного рака прямой кишки при использовании таргетной терапии в сочетании с предоперационной лучевой терапией.

Работа была выполнена на базе государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Иркутский областной онкологический диспансер» в онкологическом отделении хирургических методов лечения – колопроктологическое. Период работы с 2013 по 2014 гг.

Лечение проведено женщине в возрасте 61 года с диагнозом «первично-множественный рак, синхронный вариант: рак прямой кишки 4-я стадия T3N2M1. Рак желудка 2-я стадия T2N0M0 4-я клиническая группа. Множественные метастазы в печень».

В ходе установления диагноза пациентке проведены следующие исследования:

Ректороманоскопия: в ампуле прямой кишки на 5 см от анального канала с 2 до 8 ч условного циферблата визуализируется опухолевидное образование до 4,0 см в диаметре, контактно кровоточит, покрыто толстым слоем окрашенной слизи.

Биопсия № 72457-8/13 – в кусочках опухоли прямой кишки строение умеренно дифференцированной аденокарциномы.

Фиброгастродуоденоскопия: на слизистой антрального отдела желудка по передней стенке, ближе к большой кривизне имеется язвенный дефект диаметром 0,6 см с конвергенцией складок, глубиной до 0,4 см, дно ровное, покрыто фибрином.

Биопсия 78490-2/13: рост низкодифференцированной аденокарциномы с наличием перстневидных клеток обнаружен в краях язвы антрального отдела желудка.

Компьютерная томография органов брюшной полости и малого таза: в 4-м сегменте печени субкапсулярно, выступая по диафрагмальной поверхности печени, определяется гиподенсивное образование, размерами 18x14 мм, плотностью при нативном исследовании 28 единиц Хаунсфилда. Аналогичные образования определяются в 6, 8-м сегментах, размерами от 8 до 11 мм. Отмечается неравномерное утолщение задне-латеральной стенки прямой кишки слева до 17 мм на протяжении 70 мм с сужением просвета кишки до 4 мм. По ходу подвздошных сосудов и вдоль стенок таза увеличенных лимфоузлов не обнаружено.

Период работы с 2013 по 2014 гг. Статус K-ras гена был исследован у 33 (M/F=10/23) пациентов с диагнозами «рак ободочной кишки» – 11 пациентов (33,3 %); «рак сигмовидной кишки» – 11 пациентов (33,3 %); «рак ректосигмоидного отдела» – 2 пациента (6,2 %); «рак прямой кишки» – 9 пациентов (27,2 %). Средний возраст пациентов составил $55,3 \pm 7,6$ лет. У 5 пациентов установлена 2-я стадия заболевания, у 14 – 3-я стадия, 4-я стадия – у 14 пациентов.

Для определения статуса гена K-ras использованы праймеры для ПЦР-амплификации фрагментов, включающих кодоны 12, 13, 61 и 146. Определялись следующие виды мутаций гена K-ras: KRAS1F, KRAS1R, M13-KRASc61F, M13-KRASc61R, KRASc146F, KRASc146R.

При определении статуса гена K-ras дикий тип диагностирован у 24 пациентов (72 %), мутированный у 9 (28 %). 24 пациентам с диким типом проводится таргетная терапия препаратом Эрбитукс.

Таким образом, встречаемость дикого (72 %) и мутированного (28 %) типа гена K-ras в группе пациентов, проживающих в Иркутской области, существенно не отличаются от распределения данного гена (70 % дикий тип и 30 % мутированный) в других популяциях.

Возможности предоперационной таргетной терапии при нижеампулярном раке прямой кишки

Одной из наиболее проблематичных областей для хирургического вмешательства является нижеампулярный рак прямой кишки и местнораспространенный рак прямой кишки с переходом на нижеампулярный отдел.

Важной особенностью, обуславливающей особо агрессивное течение нижеампулярного рака прямой кишки, является тот факт, что среднеампулярный и нижеампулярный отделы, в отличие от вышеампулярного, лишены серозного покрова. Это обстоятельство подвигло Американский объединенный комитет по исследованию рака в 2002 г. предложить особый вариант классификации нижеампулярного рака прямой кишки в зависимости от инвазии опухоли в параректальную клетчатку.

Результаты выживаемости в данных группах оказались более чем впечатляющие – разница в степени инвазии в 5 мм приводила к возрастанию процента рецидива опухоли в 3–6 раз, выживаемость снижалась в 1,5–2 раза.

Основной механизм развития злокачественных опухолей, в том числе и рака толстой кишки, – соматические генетические повреждения. Одним из наиболее значимых событий в молекулярном патогенезе колоректального рака являются активирующие мутации в генах семейства ras (H-ras, K-ras, N-ras). Встречаемость данных мутаций в опухолях толстой кишки, по данным различных авторов, колеблется от 30 до 50 %.

Послеоперационный период протекал без осложнений – проводилась адьювантная химиотерапия в режиме *FOLFOX*, в сочетании с таргетной терапией (цетуксимаб 450 мг еженедельно).

Спустя 28 месяцев после проведенного лечения пациентка с диагнозом «рак прямой кишки 4-я стадия T3N2M. 4-я клиническая группа, множественные метастазы в печень» скончалась на фоне прогрессирования основного заболевания.

Таким образом, описанный клинический случай является примером эффективной терапии метастатического нижеампулярного рака прямой кишки. Сочетание предоперационной лучевой терапии и таргетной позволяет влиять локально на опухолевый процесс, способствуя выполнению сфинктеросохраняющей операции, а также – комплексно на метастатический процесс, увеличивая радикальность выполняемой операции путем увеличения степени лечебного патоморфоза в метастатических лимфатических узлах и пораженной ткани печени.

Заключение

Несмотря на все достижения современной медицины, внедрение новых методов диагностики и лечения, заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире продолжает неуклонно расти. Доклинический период развития злокачественной опухоли охватывает промежуток от момента возникновения первых раковых клеток до появления первичных клинических признаков заболевания, позволяющих установить диагноз.

Первичная и вторичная профилактика РТК основывается на представлении о ступенчатом колоректальном канцерогенезе, который характеризуется тканеспецифичными мутациями, вовлеченностью и взаимодействием генов, ответственных за опухолевую прогрессию и генетическую нестабильность и ассоциированных с различными морфологическими стадиями развития заболевания. Методы диагностики, скрининга и профилактики, направленные на снижение заболеваемости и смертности при РТК, широко обсуждаются в настоящее время.

Первичная профилактика нацелена на выявление герминальных мутаций, определяющих высокий риск развития рака и подтверждающих генетический диагноз. Показано, что скрининг с целью ранней диагностики на 56 % снижает риск развития РТК и на 65 % – общую смертность среди пациентов с онкологически отягощенным анамнезом [12].

Совершенно очевидно, что эмпирический подход к выбору противоопухолевой терапии устаревает. Новые знания о функционировании опухолевой клетки, выявление мишеней для воздействия лекарственных препаратов, недостаточная эффективность цитостатиков мотивируют к поиску путей индивидуализации специфической терапии на основе молекулярных маркеров. Бесспорно, что это не решит все проблемы противоопухолевой терапии, однако не вызывает сомнения, что использование молекулярных тестов позволяет индивидуализировать лечение для подавляющего большинства больных.

С учетом стенозирующего роста опухоли первым этапом пациентке выполнена лапароскопическая транзверзостомия.

Для определения статуса генов K-ras N-ras использованы праймеры для ПЦР-амплификации фрагментов, в ходе исследования мутации не обнаружено.

Пациентке проведен предоперационный курс дистанционной гамма-терапии на аппарате «АГАТ-Р1» в классическом режиме фракционирования. Проводилось облучение прямой кишки, параректальной клетчатки и регионарных лимфоузлов (РОД 2 Гр. СОД 44 Гр.); паховых лимфоузлов с обеих сторон.

Облучение осуществлялось на фоне таргетной терапии: внутривенное введение цетуксимаба 1 раз в неделю четырехкратно (суммарная доза 1900 мг). 1-е введение цетуксимаба 652 мг (нагрузочная доза), затем еженедельное введение цетуксимаба 450 мг (поддерживающая доза).

Спустя 5 недель после данной схемы лечения пациентке выполнена контрольная ректороманоскопия, при которой отмечено уменьшение размеров опухолевого роста на 1 см по линейной и циркулярной протяженности.

Следующим этапом проведено хирургическое лечение в объеме: интрасфинктерная резекция прямой кишки с расширенной лимфааденэктомией, энуклеация метастазов печени, резекция желудка дистальная субтотальная в варианте Бильрот-II, лимфодиссекция Д-2.

Гистологическое исследование удаленных макропрепаратов демонстрирует в удаленной опухоли прямой кишки лечебный патоморфоз 3-й степени (рис. 8). В удаленных метастатических лимфоузлах, метастазах печени определяются обширные некрозы опухолевой ткани. Метастазы аденокарциномы кишечного типа с очаговыми некрозами также фиксировались при исследовании парааортальных лимфоузлов.

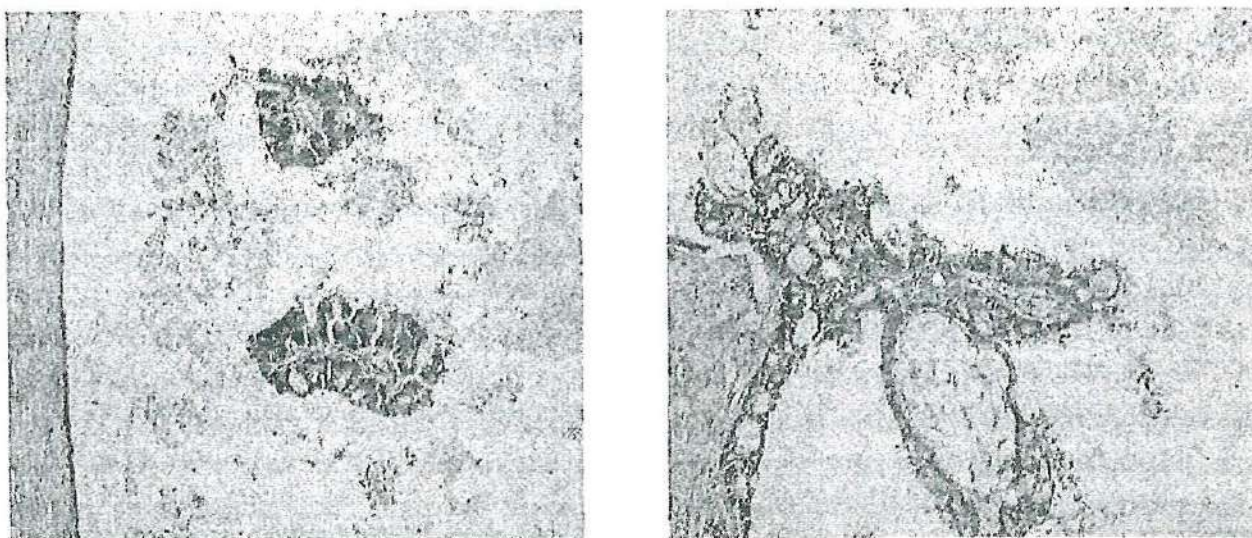


Рис. 8. Некроз опухолевой ткани в парааортальном лимфатическом узле

Библиографические ссылки

1. Артамонова, Е.В. Новые возможности в лечении рака прямой кишки / Е.В. Артамонова // Современная онкология. 2011. № 13 (3). С. 29–32.
2. Имянитов, Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. 2005. № 6 (2). С. 65–68.
3. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИРЦ», 2016. 236 с.
4. Bellacosa, A. Genetic hits and mutation rate in colorectal tumorigenesis: versatility of Knudson's theory and implications for cancer prevention / A. Bellacosa // Genes Chromosomes Cancer. 2003. Vol. 38. P. 382–388.
5. Bertario, L. Multiple approach to the exploration of genotype phenotype correlations in familial adenomatous polyposis / L. Bertario, A. Russo, P. Sala // J. Clin. Oncol. 2003. Vol. 21. P. 1698–1707.
6. Bussey, H. Historical developments in familial adenomatous polyposis / H. Bussey, L. Herrera // Familial adenomatous polyposis. New York, 1990. P. 17.
7. Crabtree, M. Explaining variation in familial adenomatous polyposis: relationship between genotype and phenotype and evidence for modifier genes / M. Crabtree, I. Tomlinson, K. Ntale // Gut. 2002. Vol. 51. P. 420–423.
8. Grady, W.M. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer / W.M. Grady, S.D. Markowitz // Ann. Rev. Genomics. Hum. Genet. 2002. Vol. 3. P. 101–128.
9. Haydon A.M. Emerging pathways in colorectal cancer development / A.M. Haydon, J.R. Jass // Lancet Oncol. 2002. Vol. 3. P. 83–88.
10. Houlston R.S. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer / R.S. Houlston // Mol. Pathol. 2001. Vol. 54. P. 206–214.
11. Iacopetta, B. Are there two sides to colorectal cancer? / B. Iacopetta // Int. J. Cancer. 2002. Vol. 101. P. 403–408.
12. Jarvinen, H. Controlled 15 year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer / H. Jarvinen, M. Aarnio, H. Mustonen // Gastroenterology. 2000. Vol. 118. P. 829–834.
13. de Jong, M.M. Low penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility / M.M. de Jong, I.M. Nolte, G.J. te Meerman // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002. Vol. 11. P. 1332–1352.
14. Kahlenberg, M.S. Molecular prognostics in colorectal cancer / M.S. Kahlenberg, J.M. Sullivan, D.D. Witmer // Surg. Oncol. 2003. Vol. 12. P. 173–186.
15. Kinzler, K. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21 / K. Kinzler, M. Nilbert, L. Su // Science. 1991. Vol. 253. P. 661–665.
16. Fearnhead, N.S. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis / N.S. Fearnhead, J.L. Wilding, W.F. Bodmer // Brit. Med. Bull. 2002. Vol. 64. P. 27–43.
17. Pasche, B. Molecular markers in prognosis of colorectal cancer and prediction of response to treatment / B. Pasche, M. Mulcahy, A.B. Benson // Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2002. Vol. 16. P. 331–345.
18. Rodriguez Bigas M. National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrom: meeting highlights and Bethesda Guidelines / M. Rodriguez Bigas, C. Boland, S. Hamilton // J. Natl. Cancer Inst. 1997. Vol. 89. P. 1758.
19. Simmonds, P.C. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group / P.C. Simmonds // BMJ. 2000. Sep 2. Vol. 321(7260). P.531–535.
20. Tonelli, F. Long term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: is there an actual efficacy in prevention of rectal cancer? / F. Tonelli, R. Valansano, L. Messerini // J. Surg. Oncol. 2000. Vol. 74. P. 15–20.
21. The International Collaborative Group on Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer / H. Vasen, J. Mecklin, P. Khan [et al.] // Dis Colon. Rectum. 1991. Vol. 34. P. 424–425.